



**Universiteit
Leiden**
The Netherlands

Neuroimmune guidance cues in vascular (patho)physiology

Vreeken, D.

Citation

Vreeken, D. (2022, April 26). *Neuroimmune guidance cues in vascular (patho)physiology*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3285014>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3285014>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).



The background of the page is a light gray, semi-transparent image of bare tree branches, creating a complex, web-like pattern. The branches are dark gray and vary in thickness, with some being thick and gnarled, while others are thin and delicate. They are set against a white background, which makes the dark gray text stand out.

Chapter 8

Nederlandse samenvatting

Curriculum Vitae

List of publications

Dankwoord

Nederlandse samenvatting

Met een totale lengte van ongeveer 100.000 kilometer, voorziet ons bloedvatenstelsel weefsels in alle delen van ons lichaam van voedingsstoffen en zuurstof en verwijdert het afvalstoffen. Daarnaast zorgt het voor verspreiding van hormonen en immuun cellen. Dit allemaal is cruciaal om een stabiele situatie, ofwel homeostase, in het lichaam te creëren welke optimaal is voor het goed functioneren van weefsels en het gezond houden van het lichaam. Als primaire barrière tussen bloed en weefsels spelen endotheelcellen, cellen die de binnenwand van de bloedvaten bekleden, een belangrijke rol in het reguleren van homeostase. Een verstoorde functie van endotheelcellen kan leiden tot verschillende ziektes waaronder hart- en vaatziekten.

Een van de belangrijkste oorzaken van hart- en vaatziekten is aderverkalking, ofwel atherosclerose. Atherosclerose is een ontstekingsreactie in de wand van de (grote) bloedvaten waardoor o.a. ontstekingscellen en vetten zich ophopen in de bloedvatwand en er een atherosclerotische plaque ontstaat. Uiteindelijk kan dit leiden tot een vernauwing van een bloedvat en verminderde doorbloeding van organen. Daarnaast kan de plaque scheuren, waardoor er kleine delen van de plaque terecht komen in de bloedbaan en verspreid door het lichaam kunnen zorgen voor verstoppingen in de kleine bloedvaten met een infarct tot gevolg. Voor een deel van de gevallen, is de oorzaak van atherosclerose terug te leiden naar de bekende risicofactoren zoals een verhoogd cholesterol, leeftijd, roken, diabetes mellitus, verhoogde bloeddruk, overgewicht of een erfelijke aanleg. Toch is een groot deel van de omgevings- en genetische factoren, die verantwoordelijk zijn voor atherosclerose, nog steeds onbekend.

Onderzoek uit de laatste decennia, toont aan dat een bepaalde groep eiwitten, de neuronal guidance cues (NGCs), een rol zouden kunnen spelen in de vasculaire biologie, ofwel de mechanismen verantwoordelijk voor het (goed) functioneren van het bloedvatenstelsel. Door een combinatie van zowel aantrekkende en afstotende signalen kunnen NGCs de groei en migratie van cellen en daarmee de aanleg van zowel het zenuw- als vatenstelsel tijdens de embryonale ontwikkeling regelen. Recentere studies laten echter zien dat NGCs ook post-embryonaal betrokken blijven in het reguleren van homeostase en ontstekingsreacties in zowel het zenuw- als vatenstelsel. NGC eiwitten zijn opgesplitst in 4 families de ephrins, netrins, semaphorins en slits. Binding van deze liganden aan bijbehorende receptoren zorgt voor activatie van verschillende signaleringsmechanismes, waaronder GTPase enzymen en verschillende kinases, waardoor verschillende processen zoals aanpassen van het cellulair skelet, celadhesie, migratie en proliferatie gereguleerd kunnen worden. NGCs komen tot expressie in o.a. endotheelcellen en immuuncellen, zoals monocyt en macrofagen,

en deze expressie wordt in een aantal gevallen gereguleerd ontstekingsfactoren. Naast het beïnvloeden van o.a. de endotheelfunctie blijken NGCs ook de adhesie en migratie van immuuncellen en daarmee ontstekingsreacties en atherosclerose te kunnen reguleren. Ondanks deze nieuwe inzichten, zijn er nog veel onduidelijkheden over de precieze functie van NGCs in de bloedvaten. Met de resultaten in dit proefschrift geven wij meer inzicht in de rol van NGCs in de vasculaire (patho)fysiologie.

Om duidelijk te krijgen welke NGCs een rol zouden kunnen spelen in een ontstekingsreactie, geef ik in **hoofdstuk 2** een uitgebreid overzicht van verschillen in expressie van NGC genen tijdens een ontstekingsreactie. Blootstelling van endotheelcellen en monocytten, beide belangrijke celtypen bij de vorming van atherosclerotische plaques, aan de ontstekingsreactie-stimulerende factoren TNF α of IL1 β zorgde voor verandering in genexpressie van veel verschillende NGC genen. De grootste verschillen werden waargenomen in de semaphorin en ephrin familie, met specifiek een grote verlaging in expressie van één van de semaphorin receptoren PlexinA4 (PLXNA4). Vervolgens, laat ik zien dat geïnduceerde verlaging van de expressie van PLXNA4 in endotheelcellen leidt tot zichtbare veranderingen in deze cellen. Deze cellen hebben een langgerekte morfologie met meer actieve stress fibers en verstoorde cel-cel contacten. Daarnaast zijn deze cellen minder goed in staat een goede endotheel-barrière en kleine bloedvatachtige structuren te vormen, wat cruciaal is voor het goed functioneren van de bloedvaten. Ook zijn barrières gevormd door deze cellen meer permeabel en laten zowel vloeistoffen als witte bloedcellen makkelijker door, wat de vorming van atherosclerose zou kunnen stimuleren. Deze studie bevestigt dat NGCs inderdaad worden beïnvloed door ontstekingsfactoren en dat PLXNA4 een belangrijke rol speelt in het behouden van goed functionerende bloedvaten.

Naast de semaphorin familie spelen ook verschillende liganden en receptoren van de ephrin familie een belangrijke rol in de vasculaire biologie. **Hoofdstuk 3** geeft een overzicht van de huidige kennis op het gebied van ephrin liganden en receptoren in met name endotheelcellen. Er is gekeken naar genexpressie, de regulatie van deze genexpressie en het effect van de verschillende liganden en receptoren op celdeling, cel migratie en interacties tussen cellen. In dit hoofdstuk laten we zien dat de ephrin familie een rol speelt in verschillende vasculaire processen en daarmee bijdraagt aan normale maar ook pathologische processen binnen de vasculaire biologie.

In **hoofdstuk 4** is specifiek gekeken naar een van de ephrin receptoren, de EPHB2 receptor. Door EPHB2 aan te kleuren in aorta weefsel in vroege en late stadia in de ontwikkeling van atherosclerotische plaques, hebben we laten zien dat de hoeveelheid van dit eiwit toeneemt naarmate de plaque verergert. De toename van EPHB2 in de gevorderde atherosclerotische plaque, zien we vooral in de monocyt en macrofagen, de immuuncellen die zich ophopen in de vaatwand en bijdragen aan de ontwikkeling van plaques. Door vervolgens de expressie van EPHB2 in monocyt en te verlagen, hebben we kunnen aantonen dat EPHB2 een belangrijke rol speelt in de adhesie en migratie van deze cellen. Verlaging van EPHB2 zorgt voor verminderde fosforylatie/activatie van focal adhesie kinases, veranderingen in het cytoskelet en daarmee, naar wij menen, verminderde adhesie en migratie van deze cellen. Ook dit hoofdstuk bevestigt dat nog een NGC, namelijk EPHB2, betrokken is bij processen die de vasculaire biologie en atherosclerose beïnvloeden.

In **hoofdstuk 5 en 6** wordt de rol van NGCs in humane atherosclerose verder verdiept door te kijken naar de effecten van genetische variaties in NGC genen van patiënten met premature atherosclerose. In **hoofdstuk 5** onderzoeken we twee genetische varianten in de ligand-receptor combinatie ephrinB2-EPHB4. Vooraf werd ingeschat dat de genetische variant in ephrinB2 het signaleringsmechanisme en daarmee ook de functie van het ligand zou kunnen verstoren. De waargenomen variant in de EPHB4 receptor zou de binding tussen de receptor en een ligand verstoren en daarmee ook de signalering en functie kunnen beïnvloeden. Onze experimenten lieten zien dat de genetische variant in ephrinB2 geen effect had op endotheel functie. Wel hebben we laten zien dat de genetische variant in EPHB4 inderdaad voor een mindere binding zorgt van de ephrinB liganden aan de EPHB4 receptor. Daarnaast zagen we bij aanwezigheid van de gemuteerde variant van EPHB4 verminderde interacties tussen endotheelcellen en pericyten. Deze verminderde interactie zou kunnen leiden tot minder stabiele en meer lekkende vaten, wat de vorming en progressie van atherosclerotische plaques zou kunnen bevorderen.

In **hoofdstuk 6** hebben we gekeken naar een genetische variatie in de netrin familie van de NGCs, Netrin-1 (NTN1). We hebben laten zien dat in vergelijking met de normale variant van NTN1, deze nieuwe genetische variant zorgt voor veranderde binding van NTN1 aan de verschillende bindingspartners van NTN1. Op cellulair niveau, hebben we aangetoond dat de genetische variant van NTN1 endotheelcellen minder beschermd tegen ontstekingsstimulerende factoren dan de 'normale' variant van NTN1. Ook remt de genetische variant van NTN1 de adhesie van monocyt en aan endotheelcellen minder

goed waardoor de vorming en groei van atherosclerotische plaques wordt versneld. Migratie van macrofagen en vasculaire gladde spiercellen werd verminderd door de genetische variant van NTN1 wat zorgt voor verminderde stabiliteit van de atherosclerotische plaques en kan leiden tot klinische complicaties.

De resultaten in dit proefschrift laten zien dat expressie van NGCs beïnvloed wordt door ontstekingsfactoren die ook van belang zijn in atherosclerose. We hebben een rol voor PLXNA4 en EPHB2 in vasculaire biologie aangetoond in respectievelijk endotheelcellen en monocytten en hebben genetische variaties in EPHB4 en NTN1 kunnen linken aan verschillende processen die belangrijk zijn in de vasculaire biologie en atherosclerose kunnen bevorderen. Bovendien, hebben we laten zien dat NGCs ver na de embryonale ontwikkeling betrokken blijven in de vasculaire biologie en kunnen bijdragen aan de ontwikkeling en progressie van atherosclerose en potentieel doorontwikkeld zouden kunnen worden tot nieuwe behandelmethoden in de strijd tegen hart- en vaatziekten.

